Aus dem Laboratorium für Immunitätsforschung und experimentelleTherapie der Abteilung für Biologie des Reichsgesundheitsamtes in Berlin-Dahlem.

Experimentelle Untersuchung über die Schutzimpfung gegen Shigaruhr.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der

Medizinischen Doktorwürde

an der

Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Berlin

vorgelegt von

Joaquin Grillo

aus Facatativá (Columbien)

Tag der Promotion: 18. 6. 1935

Druck von Gebr. Hoffmann, Bln.-Charlottenburg, Schillerstr. 44

159

Gedruckt mit Genehmigung
der
Medizinischen Fakultät der Universität Berlin
Dekan: Prof. Dr. Magnus
Referent: Prof. Dr. Zeiss.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen lieben Eltern

und

Herrn Prof. Dr. med. Hans Schlossberger

in Dankbarkeit gewidmet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550816_0058

In Anbetracht der Bedeutung, welche die bakterielle Ruhr, besonders die durch den Bazillus Shiga-Kruse verursachte Form vor allem in Kriegszeiten erlangt hat, haben sich schon zahlreiche Autoren experimentell mit der Frage beschäftigt, ob die gefährdeten Personen nicht in ähnlicher Weise, wie dies gegen Thyphus und Cholera möglich ist, auch gegen die bazilläre Dysenterie schutzgeimpft werden. Da es sich indessen bei dem Shigaschen Ruhrbazillus um einen Mikroorganismus handelt, dessen krankmachende Wirkung in erster Linie oder ausschließlich auf der Bildung eines Toxins beruht, standen diesen Bestrebungen a priori erhebliche Schwierigkeiten im Wege. Durch Erhitzen abgetöteter Aufschwemmungen des Shigabazillus verursachten bei Versuchstieren wie auch beim Menschen nach parenteraler Einverleibung recht erhebliche Reaktionen lokaler und allgemeiner Natur. Shiga schlug deshalb eine Simultanimpfung mittels Gemischen von Shigabazillen und spezifischem Antiserum vor. Diese Methode ist zwar anerkanntermaßen unschädlich; Dopter konnte jedoch nachweisen, daß die auf diese Weise erreichte Immunität nur vorübergehender Art ist, d. h. daß ihre Dauer von der Menge des einverleibten Serums abhängt, also — mit anderen Worten — daß es sich um eine rein passive Immunität handelt. Einen gewissen Fortschritt bedeutete auf dem Gebiete der Dysenterieschutzimpfung sodann die Anwendung der sensibelisierten Bakterien nach Besredka. Hier wird den Impflingen nicht antitoxisches Serum, sondern eine Aufschwemmung von Shigabazillen, die zwecks Beseitigung überschüssigen Toxins zuvor mit spezifischem Antiserum behandelt worden waren, einverleibt. Später suchte man denselben Effekt durch Einwirkung bestimmter chemischer Substanzen auf die Shigabazillen zu erreichen. Weiterhin hoffte man mit

Hilfe von Bakteriophagen und von autolysierten Dysenteriebakterien zum Ziele zu gelangen. Ausgedehnte Untersuchungen wurden ferner darüber angestellt, ob und inwieweit eine wirksame Immunisierung des Organismus gegen die Shigaruhr durch peroale Einverleibung der auf verschiedene Weise hergestellten Impfstoffe möglich ist.

Alle diese Bemühungen haben aber bisher noch nicht zu einem brauchbaren Verfahren zur Schutzimpfung gegen die durch den Shigabazillus hervorgerufene Dysenterie geführt. Es zeigte sich nämlich, daß alle diejenigen Methoden, welche eine mehr oder weniger ausgesprochene Immunität zu bewirken vermögen, gleichzeitig auch recht unangenehm lokale und Allgemeinreaktionen hervorrufen, die zweifellos als eine Wirkung des in den Impfstoffen noch vorhandenen spezifischen Toxins anzusehen sind. Andererseits ließen diejenigen Impfstoffe, nach deren Anwendung keine derartigen unerwünschten Nebenerscheinungen auftraten, im Tierversuch und auch beim Menschen überhaupt keine oder nur ungenügende immunisierende Eigenschaften erkennen.

Nach dem heutigen Stande unseres Wissens ist die Immunität gegen den Shigabazillus ausschließlich antitoxischer Art. Daher kommt es auch, daß ich mit Shigaimpfstoffe, die mittels bestimmter chemischer Substanzen entgiftet worden waren, vor allem auch durch Verwendung von Shigakulturen, die durch mehr als 2 Jahre lang fortgesetzte Fortzüchtung auf verschiedenen, mit antiseptischen Stoffen versetzten Nährböden ihre toxischen Eigenschaften verloren hatten, bei Versuchstieren keine Immunität gegen die experimentelle Infektion mit Shigabazillen erzielen konnte. Ebenso wie die übrigen Untersuchungsergebnisse zeigen auch diese Versuche, auf die ich nicht im einzelnen eingehen will, ganz deutlich, daß nur solche Impfstoffe, welche Shigatoxin in nativer oder auch in modifizierter Form, d. h. als Toxoid oder Anatoxin enthalten, bei mehrfacher, in passenden Abständen erfolgter Applikation dem empfänglichen Organismus einen ausgesprochenen Schutz gegen eine sonst tödlich verlaufende

Shigainfektion bezw. gegen eine letale Menge Shigagift zu verleihen imstande sind. Die zur Erzielung dieses Zustandes erforderliche Menge Shigatoxin oder Shigatoxoid ist jedoch recht groß. So kann man Kaninchen in 8-tägigen Abständen erst $^1/_2$, dann 1 und schließlich 2 tödliche Dosen Dysenteriegift einverleiben; diese Behandlung reicht indessen zur Erzeugung eines wirksamen Schutzes gegen die experimentelle Infektion mit lebenden Bazillen nicht aus.

In dem Bestreben, hier weiter zu kommen, sind von mir in der Abteilung für Biologie des Reichsgesundheitsamtes schon seit Frühjahr 1932, besonders an Kaninchen, daneben auch an Affen experimentelle Untersuchungen über die Möglichkeit einer Schutzimpfung gegen Shigaruhr, allerdings zunächst nur in kleinem Umfange, durchgeführt worden. Eine intensivere Bearbeitung dieser Frage war aber dann möglich geworden, nachdem auf Anregung des Herrn Generalstabsarzt Prof. Dr. Waldmann die Deutsche Forschungsgemeinschaft diesem Gebiete ihre Aufmerksamkeit zuwandte und für dessen Bearbeitung Mittel zur Verfügung stellte, die es gestatteten, auf Grund eines besonderen Arbeitsplanes die Versuche auf breiter Basis durchzuführen.

Im Laufe der von mir vorgenommenen Untersuchungen wurden zwecks Auffindung eines brauchbaren Impfstoffes gegen die Shigaruhr die verschiedensten Methoden in Anwendung gebracht. So wurde versucht, mit virulenten und auch mit abgeschwächten lebenden Shigabakterien subkutan, ferner mit abgetöteten Shigabakterien in kleinen Dosen subkutan oder in größeren Quantitäten per os, ferner durch subkutane Applikation von Shigabouillonkulturen, die mit Jod, Antiformin oder Formol behandelt worden waren, weiter durch parenterale Anwendung von Gemischen von Shigatoxin, Shigabazillen und spezifischem Antitoxin, u. a. auch von „Dysbacta" sowie von sensibilisierten Shigabazillen nach Besredka, schließlich durch Injektionen von formolisiertem Shigagift (Anatoxin) einen ausreichenden Schutz gegen eine

später erfolgende Infektion mit lebenden Shigabakterien oder die Einverleibung mehr — oder vielfacher letaler Dosen eines Shigagiftes zu erzielen. Befriedigende Resultate wurden aber nur mit einem aus formolbehandelten Shigabakterien bestehenden Impfstoff und mit Formolgiften, sog. Toxoiden oder Anatoxoiden erhalten. Die erste Methode hat den Nachteil, daß sie starke lokale Reaktionen, gelegentlich auch Allgemeinerscheinungen, wie z. B. Durchfall und Lähmungen bei den behandelten Kaninchen verursacht. Durch vermehrten Formolzusatz lassen sich diese unerwünschten Erscheinungen vermindern; dabei nimmt aber auch das Immunisierungsvermögen des Impfstoffes ab. Die zweite Methode, die erstmals von Dumas, Ramon, und Bilal angewendet wurde, gab dagegen im Kaninchenversuch gute Resultate.

Von besonderer Bedeutung erwies sich die von den letztgenannten Autoren gemachte und von Isabolinski und Kapatschewskaja bestätigte Feststellung, daß die immunisatorische Wirksamkeit eines Anatoxins von der Stärke des zu seiner Herstellung verwendeten Toxins abhängt. Ich konnte diese Angabe mehrfach bestätigen, besonders, nachdem es Prof. Gildemeister und mir gelungen war, mittels einer besonderen Methodik Gifte des Shigabazillus zu gewinnen, deren toxische Wirkung mindestens 5mal so stark ist als diejenige der bisher dargestellten Toxine des Shigabazillus, und ich dadurch die Möglichkeit hatte, Shigagifte der verschiedensten Stärke vergleichend zu prüfen. Ohne mich bei der Darstellung dieser hochwirksamen Gifte, deren letale Mindestmenge für Kaninchen von 2 kg Gewicht $^1/_{700}$ bis $^1/_{1200}$ ccm beträgt weiter aufzuhalten, möchte ich nur erwähnen, daß unter Umständen ein an und für sich schwaches Gift nach Formolzusatz ein wirksames Anatoxin liefern kann, als ein wesentlich stärkeres Gift; dies ist dann der Fall, wenn in der schwächeren Toxinlösung a priori eine größere Toxinmenge vorhanden ist.

Die zur Umwandlung von Shigatoxin in Toxoid erforderliche Formolmenge wird von Glatow mit 3—4 $^0/_{00}$,

von Dumas und seinen Mitarbeitern mit 4—6 $^0/_{00}$ angegeben. Verschiedene Autoren (Lesbré und Verdeau, de Asis) konnten aber feststellen, daß das Shigagift durch einen Formolzusatz von 2,5—6 $^0/_{00}$ zwar erheblich abgeschwächt, seiner Toxizität aber noch nicht vollkommen beraubt wird. Durch die von Vaucel u. Boisseau sowie Rodhein an Menschen durchgeführten Impfversuche wurde diese Tatsache bestätigt. Auch bei meinen Untersuchungen hat es sich gezeigt, daß bei Dysenteriegiften, von denen $^1/_{500}$ ccm und weniger zur Tötung eines Kaninchens ausreicht, eine vollkommene Entgiftung durch Zusatz von 4—6 $^0/_{00}$ Formol nicht erreicht werden kann; so wies ein Dysenteriegift, das noch in der Menge von 0,001 ccm Kaninchen tötete, nach Zusatz von 6 $^0/_{00}$ Formol und 40 Tage langem Aufenthalt bei 40° nur eine Abschwächung auf. Im Gegensatz hierzu ergab sich aber, daß selbst sehr starke Dysenteriegifte durch Zufügen von 12 $^0/_{00}$ 35 %igen Formols ihre Giftigkeit vollkommen verlieren Es soll damit natürlich nicht gesagt sein, daß ein Zusatz von 12 $^0/_{00}$ Formol nun das Optimum für alle Dysenterietoxine darstelle. Vielmehr möchte ich ganz besonders hervorheben, daß die Größe des optimalen Formolzusatzes bei verschiedenen Giften verschieden sein kann; maßgebend sind hierfür die Stärke des Giftes und auch die chemische Zusammensetzung des bei der Herstellung des Giftes zur Züchtung der Bazillen verwendeten Nährbodens. Durch Zugabe zu hoher Formoldosen wird das Shigatoxin vollkommen zerstört.

Nach meinen Erfahrungen wird die Ueberführung der Shigagifte in Toxoide mittels Formol durch die Einwirkung einer Temperatur von 40° besonders begünstigt. Unter diesen Bedingungen und bei Anwendung von 12 $^0/_{00}$ Formol wird die Toxizität eines Shigagiftes innerhalb von 5 Tagen auf etwa die Hälfte reduziert; in der Folgezeit geht der Umwandlungsprozeß dann allerdings etwas langsamer vor sich und ist erst nach 25—35 Tagen vollendet. Auf Grund dieser Erfahrungen habe ich die mit Formol versetzten Toxine durchweg 40 Tage lang bei 40° gehalten.

Bei der Herstellung der Shigaanatoxine ging ich daher im einzelnen in der Art vor, daß ich meist nur starke Gifte verwendete, dieselben mit 12 ‰ 35 %igen Formols versetzte und dann die mit paraffinierten Korkstopfen verschlossenen Kolben 40 Tage lang im 40°-Brutschrank hielt; um die Umwandlung der Gifte zu beschleunigen, wurden die Kolben von Zeit zu Zeit stark umgeschüttelt. Die von mir in dieser stets gleichen Weise im Reichsgesundheitsamt bereiteten Toxoidlösungen hatten pH von 6,6—6,8; für Immunisierungszwecke war daher eine Neutralisierung derselben nicht notwendig.

Die nach der geschilderten Technik gewonnenen Toxoidlösungen wurden zunächst auf Unschädlichkeit und dann auf immunisierende Eigenschaften geprüft.

Zur Feststellung der Unschädlichkeit wurde einmal 6 Mäusen im Gewicht von 15—22 g je 0,5 ccm einer Anatoxinverdünnung 1:2 intravenös eingespritzt; starben im Verlauf von 8 Tagen 3 oder mehr von diesen 6 Mäusen, so wurde die Toxoidlösung nicht weiter verwendet. Waren jedoch nach einer Woche noch mindestens 4 Mäuse am Leben, so erhielten 3 Kaninchen im Gewicht von 1500—2000 g je 10 ccm des unverdünnten Anatoxins ebenfalls intravenös eingespritzt. Diese Tiere wurden dann 15 Tage lang genauestens hinsichtlich des etwaigen Auftretens toxischer Erscheinungen, wie Durchfall, Paraplegien, Lähmungen etc. beobachtet; war etwas derartiges festzustellen oder starb gar das eine oder andere Kaninchen an der Giftwirkung, so wurde das betreffende Anatoxin ebenfalls ausgeschaltet. Bemerkt sei jedoch, daß bei den mit 10 ccm Dysenterieanatoxin behandelten Kaninchen in den ersten Tagen eine vorübergehende Gewichtsabnahme festzustellen ist, die aber nichts zu bedeuten hat.

Auf Grund eingehender Untersuchungen bin ich zu der Ueberzeugung gelangt, daß der Immunisierungswert eines Shigatoxoids von seinem Antitoxinbindungsvermögen abhängig ist. Manche Autoren stehen zwar auf dem Standpunkt, daß bei der Prüfung von Diphtherie- und Tetanusanatoxinen mittels dieser Art der Wertbemessung und

auch mit der Ramon'schen Flockungsmethode nicht so sichere Resultate erhalten werden wie durch den Immunisierungsversuch am Tier. Dem gegenüber hat aber die Feststellung des Antitoxinbindungsvermögens der Formolgifte, abgesehen von den geringeren Kosten, den Vorteil, daß sie einfach auszuführen ist und daß bei ihr individuelle Faktoren, wie sie gerade bei Immunisierungsversuchen mit Shigatoxiden nicht selten zu beobachten sind, keine Rolle spielen. Vor allem hat es sich aber in meinen Untersuchungen gezeigt, daß zwischen dem Antitoxinbindungsvermögen der Shigatoxoide und den im Blute der damit immunisierten Tiere durchschnittlich nachweisbaren Antitoxinmengen ein direkter Zusammenhang besteht (s. Tab. 5). Das Urteil über den Immunisierungswert eines Anatoxins kann man dadurch, daß man Kaninchen damit vorbehandelt und die Tiere dann später auf ihre Immunität prüft, natürlich noch mehr sichern.

Bei der von mir ausgearbeiteten Auswertungsmethode wird das Antitoxinbindungsvermögen der Shigaanatoxinlösungen mittels eines genau bekannten antitoxischen Ruhrserums und eines exakt eingestellten Shigagiftes festgestellt. Es wird dabei in der Weise vorgegangen, daß konstante Mengen des unverdünnten Formolgiftes mit einer internationalen Einheit Antitoxin gemischt und daß dann diesen Gemischen nach mindestens 2-stündigem Stehen bei 37° fallende Bruchteile einer L †-Dose des Testgiftes gewissermaßen als Indikator zugefügt werden. Nach genau 10 Minuten werden die Mischungen Mäusen von 18—20 g langsam (0,5 ccm pro Minute) intravenös injiziert. Auf diese Weise läßt sich genau ermitteln, wieviel von dem nachträglich zugesetzten Toxin neutralisiert wurde, und daraus die von dem Anatoxin gebundene Antitoxinmenge exakt berechnen.

Um glatte Reihen zu erzielen, empfiehlt es sich, für jedes Anatoxin-Antitoxin-Toxin-Gemisch, wie auch sonst üblich, 3 Mäuse zu verwenden und dementsprechend so, wie dies auch in der Tabelle I dargestellt ist, die 4fachen Mengen der einzelnen Komponenten miteinander zu mi-

Tabelle 1.

[(1 AE + 0,1 ccm Anatox.) 2 Std. 37°C + x Toxin] 10′ —➤ †4

Röhrchen	Antitoxin AE	Antitoxin in ccm	Anatoxin (unverdünntes)	NaCl	Bindungszeit bei 37° C	Toxinmenge L † in 0,1 ccm	Toxinmenge in ccm	Bindungszeit 15° C	i v gespritzte Menge pro Maus (18 bis 20 g) ccm	Zahl der Tiere
1	4	0,4	0,4	0,8	2 Std.	1	0,4	10	0,5	3
2	4	„	„	„	„	0,9	„	„	„	3
3	4	„	„	„	„	0,8	„	„	„	3
4	4	„	„	„	„	0,7	„	„	„	3
5	4	„	„	„	„	0,6	„	„	„	3
6	4	„	„	„	„	0,5	„	„	„	3
7	4	„	„	„	„	0,4	„	„	„	3
8	4	„	„	„	„	0,3	„	„	„	3
9	4	„	„	„	„	0,2	„	„	„	3
10	4	„	„	„	„	0,1	„	„	„	3

schen. Für die Durchführung der Prüfung genügen im allgemeinen 10 verschiedene Mischungen, die in der Weise angesetzt werden, daß man in 10 Reagenzgläser zunächst je 4 internationale A.E. im Volumen 0,4 ccm, je 0,4 ccm des unverdünnten Anatoxins und 0,8 ccm physiologischer Kochsalzlösung einfüllt und diesen Mischungen nach 2stündigem Aufenthalt bei 37° je 0,4 ccm fallender Giftverdünnungen zusetzt. Von diesen Giftverdünnungen enthält die erste 1 L †-Dose, die zweite $^{9}/_{10}$, die dritte $^{8}/_{10}$ einer L †-Dose usw.; in 0,4 ccm sind also 4, 3,6, 3,2, etc. L †-Dosen enthalten. Da die Gemische schon 10 Minuten nach dem Giftzusatz Mäusen injiziert werden müssen, ist es notwendig, die Toxinverdünnungen nicht gleichzeitig, sondern in gewissen Abständen in die Antitoxin-Anatoxin-Gemische einzufüllen. Das Gesamtvolumen jeder Mischung beträgt 2 ccm, wovon 3 Mäuse je 0,5 ccm intravenös injiziert erhalten. Entsprechend meinen bisherigen Darlegungen bestehen diese Einzeldosen aus 1 A.E., 0,1 ccm

Anatoxin und fallenden Toxinmengen, die sich zwischen 1 L †- und $_{1\ 10}$ L †-Mengen bewegen. Die Tiere werden 4 Tage lang beobachtet. Maßgebend für die Berechnung des Antitoxinbindungsvermögens des Anatoxins ist die geringste Giftmenge, welche unter den geschilderten Verhältnissen noch mindestens 2 von den 3 injizierten Mäusen tötet. Wenn also beispielsweise alle mit den ersten 6 Gemischen und 2 der mit dem 7. Gemisch injizierten Mäuse innerhalb von 4 Tagen nach der Einspritzung unter den Erscheinungen der Dysenterievergiftung eingehen, so würde daraus folgen, daß in den Gemischen $^{3}/_{10}$ AE frei, also $^{7}{}_{10}$ AE durch 0,1 ccm Anatoxin gebunden waren; durch 1 ccm des betreffenden Anatoxins würden also 7 AE verankert. Der Bindungswert oder Ativitätslimes LA einen solchen Anatoxins wäre dann als 7 zu bezeichnen.

Die Möglichkeit, daß von 0,1 ccm eines gewöhnlichen Shigaanatoxins mehr als eine AE gebunden wird, ist sehr gering. Dagegen werden derart starke Antitoxinbindungswerte bei konzentrierten Anatoxinen häufig gefunden. In diesen Fällen erfolgt die weitere Auswertung der Anatoxinlösungen nach der Formel:
[(2 AE + 0,1 ccm Anatoxin) 2 Std. 37° x Toxin)] 10 Min. ➤†4
Die Antitoxinmenge wird also hier verdoppelt, während die Anatoxin- und Toxindosen unverändert bleiben. Die Berechnung ist auch dieselbe wie vorhin; dem erhaltenen Werte ist jedoch die Zahl 10 zuzuzählen, die der von dem Anatoxin vollkommen gebundenen ersten AE entspricht.

Die bei der geschilderten Auswertung von Shigaanatoxinen angegebenen Bindungszeiten wurden, wie es in der Tabelle 2 dargestellt ist, nicht willkürlich gewählt, sondern auf Grund eingehender Untersuchungen als optimal erkannt. Es ergab sich nämlich, daß ein bestimmtes Anatoxin innerhalb von 24 Stunden oder 48 Stunden nicht mehr Antitoxin bindet, als in 2 Stunden, daß also diese Zeitspanne von 2 Stunden für die Anatoxin-Antitoxin-Bindung ausreicht. Andererseits konnte ich feststellen, daß

Tabelle 2

Toxin vom	Formolzusatz in ccm p. M.	Anatoxin	Bindungszeit (Anti-Anatoxin)	Toxin	Minuten nach dem Toxinzusatz	Wert LA.	Atoxitätsprobe
21. 9. 34	—	—	24	Testtoxin Bt. 8. 8. 34	10	7.27	450 LD. p. ccm
„	—	—	2	„	10	7.27	„
„	—	—	1/2	„	10	7.27	„
21. 9. 34	4	C. 21. 9.	2	„	10	5.45	ca. 50 LD. p. ccm
„	6	D. 21. 9.	2	„	10	5.45	ca. 35 LD. p. ccm
„	8	E. 21. 9.	2	„	10	5.45	ca. 7 LD. p. ccm
„	12	F. 21. 9.	2	„	10	5.45	atoxisch
21. 9. 34	12	F. 21. 9.	48	„	10	5.45	„
„	12	„	24	„	10	5.45	„
„	12	„	2	„	10	5.45	„
„	12	„	1/2	„	60	4.5	„
21. 9. 34	12	E. 1/2	2	„	10	2.72	toxisch
„	12	F. 1/2	2	„	10	2.72	atoxisch
21. 9. 34	8	E. 21. 9.	2	x Toxin Tr. 1. 3. 34	10	4,15	toxisch
„	12	F. 21. 9.	2	„	10	4,15	atoxisch

die Bindung von Antitoxin durch Shigagift viel rascher und in stärkerem Grade erfolgt als durch das entsprechende Anatoxin. Es besteht deshalb die Möglichkeit, daß eine Antitoxin-Anatoxin-Bindung durch zugesetztes Gift infolge dessen stärkerer Avidität gesprengt und so der LA-Wert erheblich herabgesetzt wird. Da dies besonders bei längerer Einwirkung des Giftes zu befürchten ist, da aber andererseits 10 Minuten zur Verankerung des freien Antitoxins an das nachträglich zugesetzte Toxin ausreichen, habe ich bei meinen Versuchen die Injektion der Gemische durchweg 10 Minuten nach dem Giftzusatz vorgenommen und dabei sehr gleichmäßige Werte erhalten. Es empfiehlt sich, bei den Anatoxinbestimmungen womöglich stets dasselbe exakt eingestellte Testtoxin zu verwenden, um die zwischen verschiedenen Shigagiften bestehenden Aviditätsunterschiede auszuschalten. Die Vergleichbarkeit der bei den einzelnen Auswertungen erhaltenen Resultate wird dadurch gewährleistet, daß man ein Standardanatoxin als Vergleichsmaßstab mitprüft.

Die beschriebene Methode entspricht dem von Henseval und Nélis (vgl. auch Glenny, Pope und Waddington) zur Wertbemessung der Diphtherieanatoxine angegebenen Verfahren. Von der sogenannten Kraus'schen Methode (s. auch Baecher, Kraus und Löwenstein) unterscheidet sie sich zunächst durch andere Bindungszeiten, vor allem aber durch die Verwendung konstanter Toxoid- und fallender Toxinmengen, während Kraus umgekehrt bei gleichbleibenden Giftmengen die Toxoiddosen variiert hat nach folgender Formel:
[(2 AE + x Toxoid) 1 Std. + L †] $^1/_2$ Std. ⟶ †4.

Was dann noch den von Schmidt und Scholz für die Bewertung der Diphtherieanatoxine eingeführten Quotienten $\frac{LBp}{LBa}$ anbelangt, so wäre dazu in Uebereinstimmung mit Fischer zu sagen, daß sich dieser Index mit der Verdünnung eines Toxoids nicht ändert, sondern konstant bleibt, weil er nicht die Menge des Anatoxins, sondern dessen Affinität für das Antitoxin bestimmt; als Maß-

Tabelle 3.

Kaninchenimmunisierung mit verschiedenen Shiga-Anatoxinen.

Tier Nr.	Anatoxin	Wert d. Anatox. L A.	Anatoxingehalt in 1 c. c. Serum	Resistenzprobe. 60 1. D. Shiga-toxin i. v. 20 Tg. nach Behandlg.	Durchschnittlicher Antitoxingehalt	Widerstandsfähige Tiere nach Einspritzung von 60 1. D. Tox.
283	f. T. 500					
	23. 4. 34		2. AE	o. B.		
284	„		4. AE	„		
285	„		1,7. AE	„	2.64 AE	3/3
280	f. T. 1000					
	23. 4. 34		9. AE	„		
281	„		4. AE	„		
282	„		4. A	„	5.66 AE.	3/3
275	f. T 1200					
	8. 5. 34		2. AE	„		
276	„		4. AE	„		
277	„		8. AE	„		
278	„		9. AE	„		
279	„		9. AE	„	5.3 AE.	5/5
718	F. 27. 9. 34	5.4	2. AE	„		
723	„	5.4	8. AE	„		
719	„	5.4	8. AE	„		
757	„	5.4	2. AE	„		
597	„	5.4	1. AE	†		
738	„	5.4	2. AE	o. B.	3.8 AE	5/6
789	E. ½ 21. . 34	2.72	2. AE	„		
788	„	2.72	1. AE	„		
759	„	2.72	1. AE	„		
757	„	2.72	1. AE	„		
706	„	2.72	1. AE	„		
652	„	2 72	2,5. AE	„	1.40 AE	6/6
638	1. 4. 12. 34	7.27	4. AE	„		
639	„	7.27	2,5. AE	„		
784	„	7.27	5. AE	„		
783	„	7.27	4. AE	„		
782	„	7.27	5. AE	„		
785	„	7.27	2,5. AE	„	4.5 AE	6/6
358	2. 4. 12. 34	9 09	6. AE	„		
669	„	9.09	10. AE	„		
794	„	9.09	5. AE	„		
795	„	9.09	4. AE	„		
751	„	9.09	5. AE	„		
756	„	9.00	7. AE	„	6.16 AE	6/6
803	3. 4. 12. 34	4.54	2. AE	„		
732	„	4.54	2,5. AE	„		
644	„	4.54	1. AE	„		
537	„	4.54	2,5. AE	„		
800	„	4.54	1. AE	†		
651	„	4.54	1. AE	†	1.66 AE	4/6

Tabelle 4.

Immunisierung von Kaninchen mit verschiedenen Shiga-Antitoxinen.

Tier Nr.	Anatoxin	Wert d. Anatox. L. A.	Antitoxingehalt in 1 c. c. Serum	Resistenzprobe. 60 1. D. Shiga-Toxin i. v. 20 Tg. nach Behandlg.	Durchschnittlicher Antitoxingehalt	Widerstandsfähige Tiere nach Einspritzung von 60 1. D. Tox.
284	4. 5. 12. 34	4.54	2.5 AE	o. B.		
570	„	4.54	2.5 AE	„		
552	„	4.54	1. AE	†		
860	„	4.54	1. AE	o. B.		
598	„	4.54	1. AE	„		
740	„	4.54	1. AE	†	1.50 AE	4/6
672	5. 5. 12. 34	5.45	1. AE	o. B.		
671	„	5.45	1. AE			
670	„	5.45	4. AE	„		
367	„	5.45	2.5 AE	„		
349	„	5.45	4. AE	„		
594	„	5.45	2.5 AE	„	2.50 AE	6/6
802	Poly. 1 17, 1. 35	5.45	2. AE	o. B.		
357	„	5.45	5. AE	„		
608	„	5.45	4. AE	„		
800 A	„	5.45	2,5 AE	„		
759	„	5.45	4. AE	„		
860	„	5.45	2.5 AE	„	3.33 AE	6/6
719	Poly. 4 17, 1. 35	2.72	0.8 AE	†		
600	„	2.72	0.5 AE	†		
742	„	2.72	1. AE	o. B.		
692	„	2.72	0 8 AE	†		
687	„	2.72	1. AE	o. B.		
240	„	2.72	0.8 AE	†	0.81 AE	2/6
771	3,2/1 4. 12. 34	9.5	2.5 AE	o. B.		
816	„	9.5	4. AE	„		
111	„	9.5	15. AE	„		
109	„	9.5	9. AE	„		
767	„	9.5	9. AE	„		
302	„	9.5	2.5 AE	„	7. AE	6/6
108	2,2/1 4. 12. 34	10.6	15. AE	o. B.		
110	„	10.6	5. AE	„		
106	„	10.6	4. AE	„		
107	„	10.6	2.5 AE	„		
304	„	10.6	9. AE	„		
819	„	10.6	9. AE	„	7.41 AE	6/6

Tabelle 5.

Shigatoxin vom	D. l. m. für Kaninchen (2 kg)	Formolzusatz	Anatoxin	pH. d. Anatox.	LA.-Wert	Durchschnittl. Antitoxingehalt im Blut von 6 Immuntieren	Widerstandsfähige Tiere nach Einspritzung v. 60 l. D. Toxin.
12. 2. 34	1/500	12 p. M.	fT. 500 23. 4. 34	6.8	—	2.64 AE	3/3
20. 2. 34	1/1000	„	fT. 1000 23. 4. 34	6.6		5 66 AE	3/3
4. 5. 34	1/1200	„	fT. 1200 8. 5. 34	6.6		5.30 AE	5/5
21. 9. 34	1/450	„	F. 27. 9. 34	6.7	5.45	3.80 AE	5/6
21. 9. 34	1/450	8 p. M	E. 1/2 21. 9. 34	6.6	2.72	1.40 AE	6/6
25. 9. 34	1/600	12 p. M.	1. 4. 12. 34	6.6	7 27	4.50 AE	6/6
8. 10. 34	1/1000	„	2. 4. 12. 34	6.6	9.09	6.16 AE	6 6
29. 9. 34	1/450	„	3. 4. 12. 34	6.6	4.54	1.66 AE	4/6
7. 10. 34	1/100	„	4 5. 12. 34	6.8	4.54	1.50 AE	4/6
7. 10. 34	1/100	„	5. 5. 12. 34	6.6	5.45	2.50 AE	6/6
25. 9. 34	1 600	„	Poly. 1. 17. 1. 35	6.6	5.45	3.33 AE	6/6
7. 10. 34	1/100	„	Poly. 4. 17. 1. 35	6.8	2.72	0.81 AE	2 6
29. 9. 34	1/450	„	3.2/1 4. 12. 34	—	9.5	7. AE	6 6
8. 10. 34	1 1000	„	2.2/1 4. 12. 34	–	10.6	7.41 AE	6/6

stab für das Immunisierungsvermögen eines Anatoxins kann dieser Wert deshalb nicht angesehen werden.

Es wäre nun noch die Frage zu besprechen, ob die eben beschriebene Methode tatsächlich eine exakte Titrierung von Shigaanatoxinen und ihres Immunisierungsvermögens gestattet. Als Beweis dafür, daß sich mittels des Verfahrens eine genaue quantitative Anatoxinbestimmung durchführen läßt, kann die Feststellung gelten, daß der LA-Wert von Anatoxinlösungen durch Verdünnung oder Einwirkung von Adsorbentien eine entsprechende Abnahme, durch Konzentration (z .B. mittels Ausfällung) eine entsprechende Zunahme erfährt.

Für die Zwecke der Praxis wesentlich wichtiger ist der zweite Teil der Frage, ob nämlich das Antitoxinbindungsvermögen eines Shigatoxoids seinem Immunisierungswert parallel geht. Dadurch, daß sich Kaninchen mit Hilfe von formolisierten Shigagiften mit Erfolg immunisieren lassen, war die Möglichkeit gegeben, hier eine Klärung herbeizuführen. Ich ging dabei in der Weise vor, daß ich die Tiere in 8-tägigen Abständen dreimal mit steigenden Anatoxindosen (0,5, 1,0, und 1,5 ccm) subkutan behandelte. Zwischen dem 10. und 15. Tag nach der letzten Impfstoffeinspritzung wurde den Kaninchen Blut entnommen und auf seinen Antitoxingehalt genau untersucht. Etwa 3 Wochen nach Abschluß der Impfung erhielten die Tiere 60 tödliche Dosen eines Shigatoxins intravenös injiziert.

Aus der zusammenfassenden Tabelle 3 lassen sich die Resultate dieser Prüfungen ersehen. Die ersten 3 Versuche waren zu einer Zeit ausgeführt, in der die vorhin geschilderte Methode zur Wertbemessung der Anatoxine noch nicht ausgearbeitet war; der Erfolg der Impfung ist aber augenscheinlich, da die 11 schutzgeimpften Kaninchen die Einverleibung von 60 tödlichen Dosen Shigagift glatt ertrugen. Aus den nächsten 5 Versuchen, von denen jeder an 6 Kaninchen angestellt wurde, ergibt sich, daß die im Blut der behandelten Tiere nachweisbare Antitoxinmenge tatsächlich von dem Antitoxinbindungsvermögen des verwendeten Impfstoffes abhängig ist. Auch aus den

in der nächstfolgenden Tabelle 4 aufgeführten Resultaten lassen sich dieselben Schlußfolgerungen ziehen. Vor allem aber ergibt sich hier ganz eindeutig, daß die Shigaruhrimmunität schutzgeimpfter Kaninchen von dem Antitoxingehalt ihres Blutes abhängt; bei Tieren mit niedrigen Antitoxinwerten führte die Giftinjektion unter den typischen Erscheinungen zum Tode.

Ferner sei darauf hingewiesen, daß die Schutzimpfung mit einem brauchbaren Shiganatoxin beim Kaninchen keine nennenswerten Reaktionen hervorruft.. Bei mehr als 100 schutzgeimpften Tieren habe ich in keinem Falle Allgemeinerscheinungen im Anschluß an die Anatoxininjektion feststellen können. Auch an der Impfstelle waren nur in vereinzelten Fällen geringgradige und vorübergehende Verdickungen der Haut, doch niemals Narbenbildung zu beobachten. Im allgemeinen verursachte die erste Anatoxininjektion beim Kaninchen am Orte der Einspritzung eine passargere Rötung und nur ausnahmsweise eine ebenfalls innerhalb von 12—48 Stunden sich wieder zurückbildende Hautverdickung; die 2. und die 3. Anatoxineinspritzung wurden stets reaktionslos vertragen.

Es erhob sich dann noch die für die Zwecke der Praxis wichtige Frage, ob sich nicht vielleicht durch Herstellung eines aus Shigaanatoxin und abgetöteten Pseudodysenteriebazillen bestehenden polyvalenten Impfstoff eine gleichzeitige Schutzimpfung gegen alle in Betracht kommenden Ruhrerreger durchführen lasse. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden zu einem genau ausgewerteten Shigaanatoxin durch Hitze abgetötete Aufschwemmungen atoxische Ruhrerreger zugefügt. Die so erhaltenen Impfstoffe enthielten im ccm 2 Milliarden Flexnerbazillen, $1^1/_2$ Milliarden Y-Bazillen und $1^1/_2$ Milliarden Kruse-Sonne-Bazillen und wurden dann in derselben Art, wie dies vorhin für die einfachen Shigaanatoxine dargelegt worden war, auf ihr Antitoxinbindungsvermögen untersucht (Tab. 4). Dabei ergab sich, daß durch die zugefügten Bazillen ein Teil der in der Lösung enthaltenen Toxoide absorbiert wird und daß dadurch ein Absinken des LA-Wertes um

mehr als 2 Punkte bewirkt wird. Die mit solchen polyvalenten Impfstoffen immunisierten Kaninchen wiesen eine dem LA-Wert entsprechende Menge Shigaantitoxin und außerdem Agglutinine gegenüber den Ruhrbazillen des Typus Y und des Typus Flexner auf. Antikörper gegen die Kruse-Sonne-Ruhr ließen sich indessen nicht nachweisen, doch wäre es möglich, daß der verwendete Stamm vielleicht inagglutinabel gewesen ist. Die Resistenz der immunisierten Kaninchen gegenüber einer intravenösen Injektion von 60 tödlichen Dosen Shigagift entsprach auch hier dem Antitoxingehalt des Blutes, der seinerseits wiederum von dem LA-Wert des verwendeten Impfstoffes abhing. (Nach diesen Untersuchungen, die indessen weiter fortgesetzt werden sollen, hat es also nicht den Anschein, als ob das von den zugesetzten Bazillen absorbierte Toxoid im Organismus wieder abgespalten würde und eine antigene Wirkung ausüben könnte).

Ferner wäre noch zu erwähnen, daß das Shigaanatoxin ebenso wie die Diphtherie- und Tetanustoxoide durch Ausfällung konzentriert werden kann. Bisher wurde für diese Zwecke nur Ammonsulfat verwendet, aber es ist anzunehmen, daß sich auch andere Stoffe, wie z. B. Alaun hierfür eignen werden. Da sich die durch Ammonsulfat ausgefällten Anatoxine in einer beliebigen Menge physiologischer Kochsalzlösung auflösen lassen, können auf diese Weise konzentrierte Anatoxinlösungen hergestellt werden. Hinsichtlich der Auswertung solcher verstärkter Präparate ist bereits vorher das nötige mitgeteilt.

Der schon mehrfach hervorgehobene Parallelismus zwischen dem Antitoxinbindungsvermögen LA eines Shigaanatoxins und dem durchschnittlichen Antitoxingehalt des Blutes der damit immunisierten Tiere ist außerordentlich auffallend. In der letzten Spalte der Tabelle 5 ist die Zahl der schutzgeimpften Kaninchen aufgeführt, die eine Injektion von 60 tödlichen Dosen Shigagift überstanden haben. Man ersieht daraus, daß von den mit polyvalenten Impfstoff 4 immunisierten Kaninchen nur 2 überlebten; der Antitoxingehalt betrug bei diesen Tieren im Durch-

schnitt nur 0,81 AE pro ccm. Die mit den Anatoxinen 3 und 4 geimpften Kaninchen wiesen im Durchschnitt 1,5 bezw. 1,66 AE im ccm auf; hier zeigten beide Male 2 von den je 6 Kaninchen eine ungenügende Immunität. Von den übrigen 7 Gruppen starb dann nur noch eine der mit dem an sich starken Anatoxin F geimpften Tieren im Anschluß an die Giftinjektion, trotzdem der durchschnittliche Antitoxingehalt hier ziemlich hoch war; die mit den anderen Anatoxinen schutzgeimpften Kaninchen überlebten durchweg.

Erwähnt sei noch, daß nach den Feststellungen von Dumas, Ramon und Bilal die Shigaanatoxine in verschlossenen Ampullen gut haltbar und noch nach einem Jahr voll wirksam waren. Auch von mir vor 4 Monaten hergestellte Anatoxine haben bisher keine Verminderung ihrer Wirksamkeit erkennen lassen.

Zusammenfassend läßt sich auf Grund vorstehender Untersuchungen sagen:

1. daß sich für die Zwecke der Schutzimpfung gegen Shigaruhr am besten Shigaanatoxin eignet,
2. daß wenigstens beim Kaninchen der Grad der durch ein Shigaanatoxin bewirkten Immunität der im Blute nachweisbaren Antitoxinmenge entspricht und diese wiederum von dem Antitoxinbindungswert des Anatoxins, d. h. von einem Gehalt an Toxoiden abhängt, und
3. daß die Impfung mit hinreichend geprüften Shigaanatoxinen unschädlich ist.

Nur kurz sei dann noch darauf hingewiesen, daß eine Reihe von Autoren (Dumas, Ramon und Bilal, Vaucel und Boisseau, Isabolinski, Judenitsch und Simonow, Bouffard und Vaucel, Rodhein u. a.) Shigaanatoxine mit gutem Erfolg beim Menschen angewendet haben. Die dabei beobachteten Lokalreaktionen waren nur schwach und dauerten nur wenige Stunden; Allgemeinerscheinungen wurden nur ganz ausnahmsweise festgestellt. Es erscheint aber durchaus möglich, daß sich durch ausschließliche Verwendung sorgfältig ge-

prüfter Anatoxine diese unerwünschten Reaktionen vollkommen vermeiden lassen. Vor allem aber ist auf Grund vorstehender Ergebnisse anzunehmen, daß sich durch Gebrauch hochwertiger Anatoxine, die bei der Auswertung einen LA-Wert von mindestens 5 aufweisen, die Impfresultate weiter verbessern lassen.

Literatur-Verzeichnis.

Baecher, Kraus u. Löwenstein, Ztschr. f. Immun.-Forschg. **42,** 350 (1925)

Bouffard, G. u. Vaucel, M., Bull. Soc. Path. exot., **26,** 154 (1933).

de Asis, A., Arch. Inst. Vital Brazil, **3,** 3 u. 63 (1925).

— idem Nr. 11, 1 (1929).

— Ztschr. f. Immun.-Forschg., **64,** 49 (1929).

Dopter, Ch., C. R. Soc. Biol., **63,** (1907).

— idem **64** 379 (1907).

Dumas, J. Ramon, G. u. Bilal, S., Presse méd. **1925,** 1222.

— C. R. Ac. Sci. **181,** 198 (1925).

— Ann. Pasteur, **40,** 135 (1926)

Fischer W., Ztschr. f. Immun. Forschg., **74,** 423 (1932).

— idem **75,** 191 (1932).

Gildemeister, E. u. Grillo, J., Zbl. f. Bakter. 1 Orig. **133,** 201 (1935).

Glatow, zit. nach Dumas, Ramon u. Bilal.

Glenny, Pope u. Waddington, Jour. Path. a. Bacter., **104,** 1060 (1930).

Grillo, J., Zbl. f. Bakter. 1. Ref. **118,** 41 (1935).

Henseval u. Nélis, C. R. Soc. Biol., **91,** 902 (1924).

Isabolinski, M., Judentsch, W. u. Somonow, P., Ztschr. f. Immun.-Forschg., **73,** 12 (1932).

Isabolinski, M. u. Kapatschewskaja, B. P., Ztschr. f. Immun.-Forschg. **71,** 213 (1926).

Kolle, W., Prigge, R. u. Fischer W., Med. Klin. **1932,** Nr. 2.

Lesbré, Ph., C. R. Soc. Biol., **93,** 612 u. 614 (1925).

Lesbré u. Verdeau, A., C. R. Soc. Biol., **92,** 165 (1925).

Rodhein, Bull. Soc. Path. exot., **26,** 168 (1933).

Vaucel M. u. Boisseau, R., Bull. Soc. Path. exot., **24,** 267 (1931).

Schmidt, H. u. Scholz, W., Ztschr. f. Immun.-Frschg., **73,** 517 (1932).

Shiga, K., Dtsch. med. Wschr., **1903,** Nr. 18.

Lebenslauf.

Geboren am 22. Juli 1909 in Facatativá (Columbien) als Sohn des Landwirtes Emiliano Grillo und dessen Ehe-Frau Ana D. González besuchte ich das Instituto de la Salle, welches ich 1925 mit dem Reifezeugnis verließ. Meinen Studien oblag ich in der Universität in Bogotá (Columbien), wo ich im Jahre 1931 die medizinische Approbation erlangt habe. Später habe ich dann 2 Jahre lang im Institut Pasteur in Paris, hernach mehr als 3 Jahre lang in der Abteilung für Biologie des Reichsgesundheitsamts auf dem Gebiete der Bakteriologie, Serologie, Immunitätsforschung und Chemotherapie gearbeitet. An der Universität Berlin wurde ich als Student der Medizin am 18. November 1932 immatrikuliert.

Berlin, Joaquîn Grillo.